

経皮的近赤外線照射による再内皮化の促進および 新生内膜増殖抑制に関する検討

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん遺伝子治療学
(旧講座名：内科学第一)
(主任：小林健一教授)

国 枝 武 重

近赤外線治療器は、中出力レーザーに相当する出力と水やヘモグロビンに吸収されにくい波長帯のため、深い生体深達性を示す。また近赤外線は、低出力レーザーと同様に抗炎症作用、血管内皮増殖促進作用、平滑筋遊走抑制作用を有する。これらの近赤外線の特徴から、本治療器が経皮的血管形成術後の再狭窄予防の経皮的かつ非侵襲的な治療法となる可能性がある。そこで今回その基礎的検討として、ラット頸動脈バルーン傷害後の新生内膜増殖に対する近赤外線照射の影響と、培養血管内皮細胞および平滑筋細胞におよぼす近赤外線の効果を検討した。バルーン傷害の検討は、ウィスターラット55匹を用い行った。ラット頸動脈にバルーン傷害を作成、3日間、10分間づつ経皮的近赤外線照射を行った。照射設定は最大1250 mWの70%の出力で、2秒照射4秒休止のサイクルとした。7日後および14日後に頸動脈を摘出し、非照射群と比較検討した。培養細胞の検討はヒト臍帯静脈内皮細胞、ラット大動脈平滑筋細胞に近赤外線を1, 5, 10および20 J/cm²を照射し増殖の程度を非照射群と比較検討した。ラット頸動脈バルーン傷害後の内膜/中膜比は、非照射群に比し近赤外線により1週間後で25% (P<0.05)、2週間後で49% (P<0.001)の有意な減少がみられた。1週間目の免疫組織染色では増殖細胞核抗原の陽性細胞率は近赤外線照射により25%減少した (P<0.05)。また、エバンスブルー染色による再内皮化率の評価では、近赤外線照射により49%の再内皮化率の増加がみられた (P<0.05)。培養細胞の検討では、平滑筋細胞は近赤外線照射の影響を受けなかったが、血管内皮細胞は10 J/cm²の照射で有意な増殖の促進がみられた。以上の結果から、近赤外線照射は新生内膜増殖を抑制し、その機序として再内皮化の促進による平滑筋細胞の増殖抑制が示唆された。近赤外線照射は非侵襲的かつ簡便に使用できることから、血管形成術後再狭窄の予防に対する新しい治療法となる可能性がある。

Key words near-infrared ray, restenosis, reendothelialization

現在、冠動脈や四肢末梢血管など動脈硬化性病変に対しカテーテルを用いた診断、治療が広く行われ、多大な効果をあげている。特に冠動脈疾患に関しては1977年Gruenzigによって初めて経皮的冠動脈形成術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) が施行されて以来、その臨床的な効果は大きく、現在本邦で年間約13万件施行されるに至っている。しかし、PTCAでは術後30～50%に再狭窄が生じ、その解決が臨床に重要な問題となっている¹⁾²⁾。再狭窄の問題に対してステント、方向性冠動脈粥腫切除術やロータブレードなどの新しい治療装置の導入により改善を認めているが、いまだ十分な解決は得られていない。

近年、動脈硬化性病変や心筋虚血に対する光学的治療が注目されている。光学的治療器はその出力により2種類に分類され

る。1つは光学的細胞破壊を目的としたもので、高出力レーザーが用いられる。代表的なものとして心筋にレーザーを照射し小孔を作成することで心筋虚血の改善を目的とする経心筋血管再生 (transmyocardial revascularization)³⁾⁴⁾や光感受性物質を先行投与し、その後にレーザーを照射し粥腫を破壊する光力学的治療 (photodynamic therapy)⁵⁾⁶⁾がある。もう1つは光学的活性化反応を目的としたものである。これにはヘリウムネオンレーザーや半導体レーザーに代表される低出力レーザーがあり、動脈硬化性病変に対する治療の試みが報告されている。Kipshidzeら⁷⁾はコレステロール負荷した家兎の大腿動脈にバルーン傷害を加え、その後に低出力レーザーを血管内腔より照射、8週間後に観察したところ新生内膜の増殖が有意に抑制されたと報告した。さらに彼らはヒトへの応用を試み、PTCA後に血

平成14年11月20日受付、平成15年1月8日受理

Abbreviations : α -SMA, α -smooth muscle actin; BrdU, bromodeoxyuridine; DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; I/M, intima/media ratio; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NIR, near-infrared ray; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI, proliferation index; PTCA, percutaneous transluminal coronary angioplasty; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine-5'-triphosphate-biotin nick end-labeling; VEGF, vascular endothelial growth factor

管内腔よりレーザー照射を行い、その再狭窄率を有意に抑制したとも報告した⁸⁾⁹⁾。その機序については十分に明らかではないが、平滑筋細胞の遊走抑制、内皮細胞の増殖などが示されている。しかし、高出力レーザーは細胞破壊のため血管内腔や心内腔からの局所照射が必要であり、低出力レーザーは吸収の問題からカテーテルを用い行う必要がありいずれも臨床使用には制限がある。

一方、近赤外線 (near-infrared ray, NIR) 治療器は単波長のレーザーとは異なり図1に示すように0.6から1.6 μm の限られた波長域の光線を発する。一般に0.6 μm 以下の波長域の光線はヘモグロビンによる吸収率が高いとされ、他方1.6 μm 以上の光線は水による吸収率が高いとされている。したがって、NIRの波長域は生体主要構成成分の水、血液に吸収されにくく、生体において極めて高い深達性を示す。また最高で約2000 mW

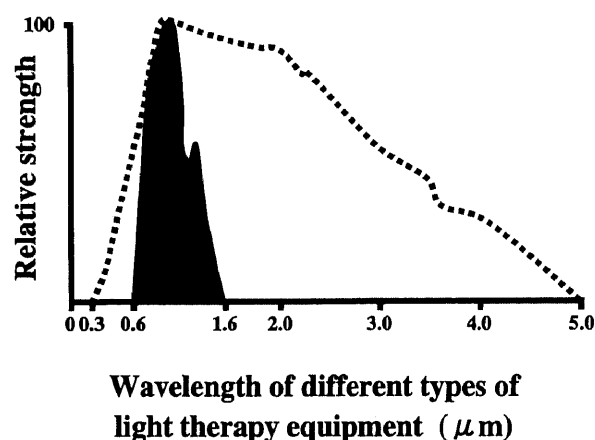


Fig. 1. Wavelength of different type of light therapy. Water barely absorbs rays below a wavelength of 1.6 μm whereas blood barely absorbs rays above a wavelength of 0.6 μm . Near-infrared ray therapy equipment emits ray with wavelength of 0.6 to 1.6 μm (closed area), which penetrate deeply into the body and are not affected by water or blood. Conventional low-output laser therapy equipment has a wide range of wavelength (dotted line), which means that it cannot produce sufficient output to obtain satisfactory effects.

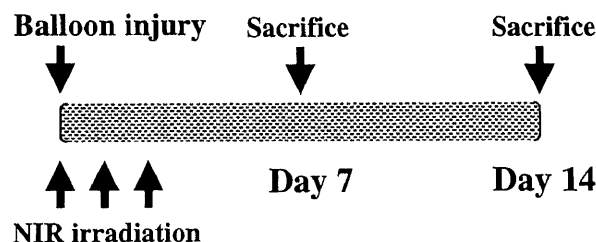


Fig. 2. Experimental design of in vivo experiments. Balloon injury of the carotid arteries was performed using Forgaty embolectomy catheter and NIR irradiated transcutaneously for 10 minutes at 3 consecutive days after injury. At 7 days or 14 days after injury, the carotid arteries were excised, defined as NIR group. Control rats underwent the same operation, except that the NIR was not irradiated, defined as control group. NIR, near-infrared ray.

の出力が得られることから、深部器官に対する十分な照射効果が期待できる。現在すでに経皮的な星状神経節へのNIR照射が疼痛治療やレイノー病などの上肢血行障害に対して臨床使用されており、星状神経節ブロックと同様の効果が得られることが報告されている^{10)~12)}。NIR照射は低出力レーザーと同様に光学的活性化反応を有し、かつ低出力レーザーと異なり深い生体深達性を示すことから、本治療器が血管形成術後の再狭窄予防に対する非侵襲的かつ簡便な新しい治療法となる可能性がある。

そこで今回、血管に対する経皮的NIR照射の臨床応用の可能性を明らかにするため、ラットバルーン傷害モデルにおける新生内膜増殖に及ぼす経皮的NIR照射の影響と培養血管内皮細胞および平滑筋細胞に及ぼす影響を検討した。

対象および方法

I. ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおける新生内膜増殖におよぼすNIR照射の影響

動物実験については金沢大学宝町地区動物実験委員会の承認を受けた (承認日: 平成14年6月7日, 承認番号: 021303号, 課題名: ラット頸動脈内皮傷害モデルに対する直線偏光近赤外線照射効果の検討)。

1. 実験動物

実験動物として体重350 gから400 gの雄性ウィスターラット55匹を用いた。実験動物の使用は金沢大学宝町地区動物実験指針にしたがった。水と餌は自由に摂取できるようにした。

2. NIR照射装置

NIR照射装置としてスーパーライザー HA-550 (東京医研, 東京) を使用し、1 cm \times 5 cmのレンズユニットにて照射した。スーパーライザー HA-550は今回使用したレンズユニット装着時、最高で1250 mWまでの出力が得られ、10%ごとに最高出力の100%まで10段階の調節ができる。また照射方法は連続法とサイクル法があり、サイクル法では照射時間と休止時間を秒単位で設定が可能である。

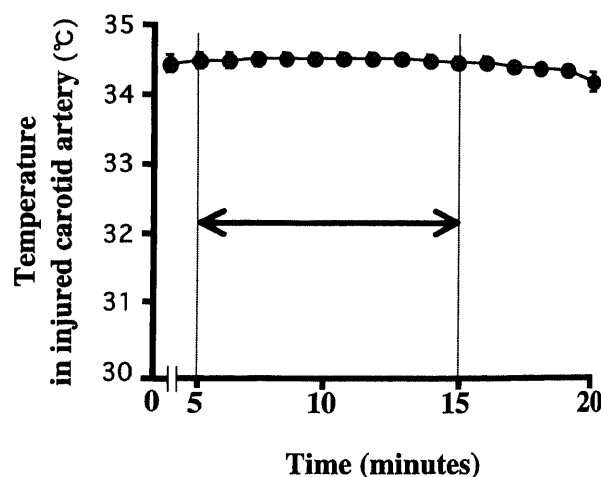


Fig. 3. Temperature changes in injured carotid arteries before (5 minutes), during (10 minutes), and after (5 minutes) NIR irradiation ($n=5$). There was no significant change in temperature during NIR irradiation. Arrow indicates NIR irradiation periods. Results are expressed as $\bar{X} \pm \text{SEM}$. NIR, near-infrared ray.

3. バルーン傷害モデルの作成と組織学的検討

麻酔はペントバルビタール (大日本製薬, 大阪) 50 mg/kg を腹腔内に投与して行った。頸部を切開し, 左外頸動脈を同定し小切開を加え, 同部位より2フレンチ・フォガティールバルーンカテーテル (バクスター, 東京) を逆行性に挿入した。大動脈-総頸動脈分岐部より内頸動脈-外頸動脈分岐部までバルーンにて3回繰り返し擦過を行った後, 切開部を結紮し閉創した。バルーン傷害作成日より傷害部位に対して3日間連続, 1日10分間の経皮的NIR照射を行った。照射設定は最大出力の70%, 2秒照射, 4秒休止の条件下で行った。傷害部位の同定は肉眼的に確認はできないため, 傷害時にあらかじめ部位を皮膚面にマークして行った。照射を行った群をNIR群とし, 対照として非照射群をコントロール群とした。手術後7日目または14日目にペントバルビタール大量投与にて屠殺後, 10%中性緩衝ホルマリンにて灌流固定を行い, 左総頸動脈を摘出した (図2)。摘

出後, パラフィン包埋して厚さ3 μ mの切片を作成し, シランコーティングスライド (Dako, 京都) に貼り付け乾燥させた。その後ヘマトキシリン染色を行った。新生内膜と中膜面積はNIH イメージ 1.62 (NIH, Rockville, USA) を用い計測し, 内膜/中膜比 (intima/media ratio, I/M) を比較検討した。

また, 照射におけるNIRによる熱の影響を検討するため, 血管表面温度の測定を行った。測定には直径1 mmの温度センサー付き測定用針をデジタル温度計 (日置電機, 長野) に接続したものを用いた。頸動脈を露出後, 針を頸動脈表面に固定し閉創した。表面温度が安定した後5分間記録を行い, その後同一の設定条件でNIRを照射し, 照射中10分間および照射終了後さらに5分間の温度測定を行った。

4. 免疫組織学的検討

キシレン (和光純薬, 大阪) を用いて脱パラフィン後, 0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ

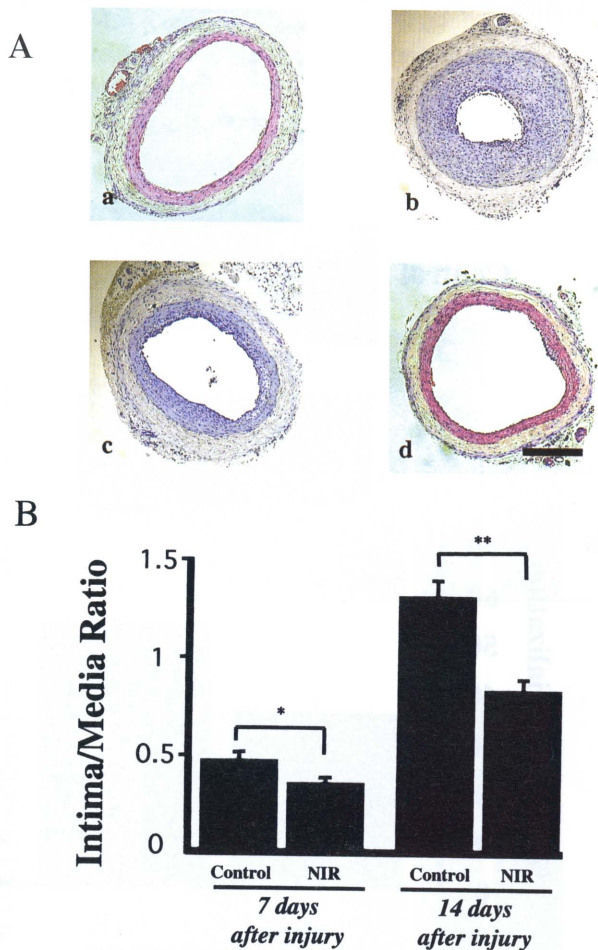


Fig. 4. Neointimal formation after vascular injury. (A) Representative photomicrographs of cross sections of carotid artery at 14 days after injury in rats with intact carotid artery (a), balloon injury only (b), balloon injury and NIR irradiation (c), and NIR irradiation only (d). Bar indicates 200 μ m. (B) Morphometric analysis of carotid arteries at 7 and 14 days after injury. I/M at day 7 and 14 in NIR group were significantly reduced than those in control group ($n=10$ in each group). Results are expressed as $\bar{X} \pm \text{SEM}$. NIR, near-infrared ray; I/M, intima/media ratio. Statistical difference between control and NIR groups. * $P<0.05$, $P<0.001$.

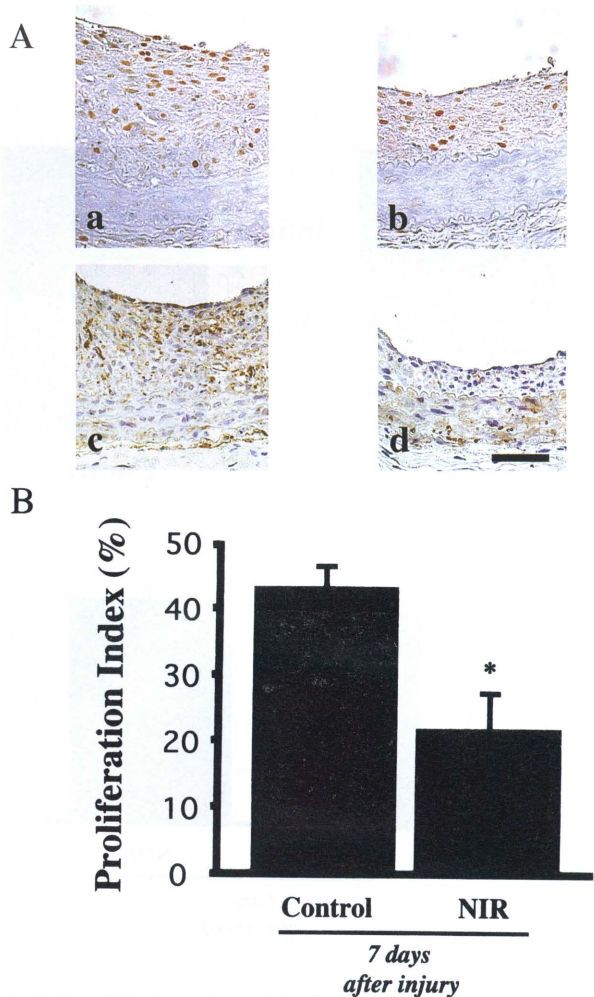


Fig. 5. Effects of NIR irradiation on smooth muscle cell proliferation after balloon injury. (A) Representative photomicrographs of immunohistochemical staining with antibody to PCNA (a, b) and α -SMA (c, d) in control group (a, c) and NIR group (b, d) at 7 days after balloon injury. Bar indicates 50 μ m. (B) Effects of NIR irradiation on proliferation index. NIR, near-infrared ray. Statistical difference between control and NIR groups. Results are expressed as $\bar{X} \pm \text{SEM}$. * $P<0.05$.

たのち、PBS (pH7.4) で洗浄し、牛血清アルブミンにて非特異的反応を除去した。一次抗体として抗ウサギ横紋筋線維アクチン (α -smooth muscle actin, α -SMA) マウスモノクローナル抗体 (Dako) と抗増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) マウスモノクローナル抗体 (Dako) を使用し、4℃で1晩反応させた。対応するビオチン化抗マウスIgG二次抗体 (Dako) を Tris-HCl緩衝液 (pH7.4) にて400倍希釈し、30分間反応させた。次にアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidine-biotin-peroxidase complex) 染色キット (Dako) にて30分間反応させた。各反応後にPBS (pH7.4) で洗浄し、発色はジアミノベンジジン免疫染色キット (フナコシ、東京) で、また核染色はヘマトキシリンにて行った。評価は新生内膜内のPCNA陽性細胞の全細胞に占める割合を増殖指数 (Proliferation Index, PI) と定義し、両群間で比較した。

5. アポトーシスの評価

NIRによるアポトーシスへの影響をみるため、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine-5'-triphosphate-biotin nick end-labeling) 法を用い検討した。パラ

フィン包埋の後、3 μ mの切片をシランコーティングスライドに固定し、MEBSTAIN II キット (医学生物学研究所、名古屋) で染色した。染色後、蛍光顕微鏡AX-80 (オリンパス、東京) を用いて観察した。全細胞のうち、陽性細胞の割合をTUNEL指数と定義し両群間で比較した。

6. 再内皮化の評価

再内皮化の評価のため、術後7日目のバルーン傷害モデルを用いた。ラット尾静脈より0.5% エバンスブルー染色液 (Sigma, St. Louis, USA) を0.5 ml 投与した。30分後ペントバルビタール大量投与にて屠殺し、逆行性に大動脈より生理食塩水 (大塚、東京) 投与を100 mmHgにて灌流液が透明になるまで行った。頸動脈は摘出後縦軸方向に切開し、100% メタノールにて固定した。エバンスブルー染色では内皮化された部位が白、内皮化されていない部位が青で染まるため、全面積のうち白で染められた割合を再内皮化率と定義し、両群間で比較した。

II. 培養細胞におよぼす NIR の影響

1. 細胞培養

培養細胞としてラット大動脈平滑筋細胞およびヒト臍帯静脈

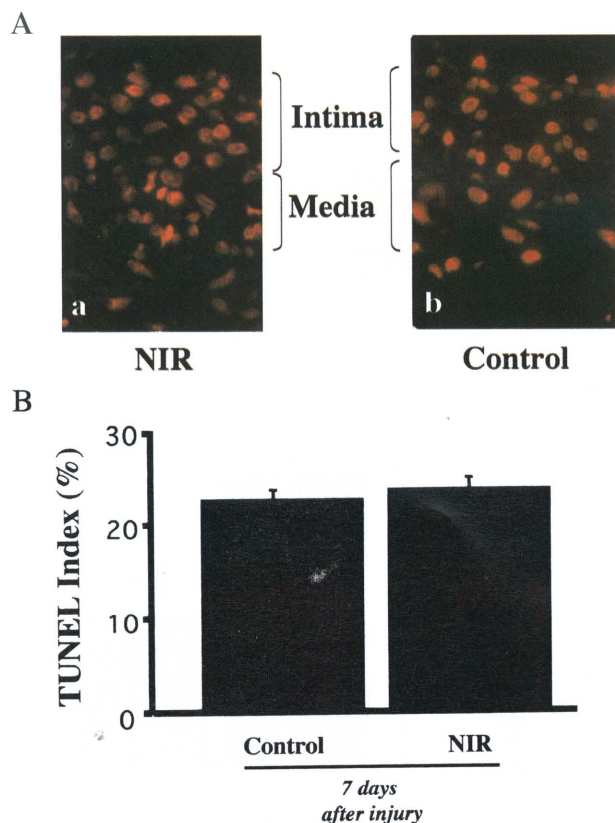


Fig. 6. In situ detection of apoptotic cells by TUNEL staining. (A) Representative micrographs of TUNEL staining in NIR group and control group at 14 days after balloon injury. Arrows indicate TUNEL-positive cells. Magnification $\times 400$. (B) Effects of NIR irradiation on TUNEL index in control and NIR groups ($n=5$ in each group). There was no significant difference between two groups. Results are expressed as $\bar{X} \pm \text{SEM}$. NIR, near-infrared ray irradiation; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine-5'-triphosphate-biotin nick end-labeling.

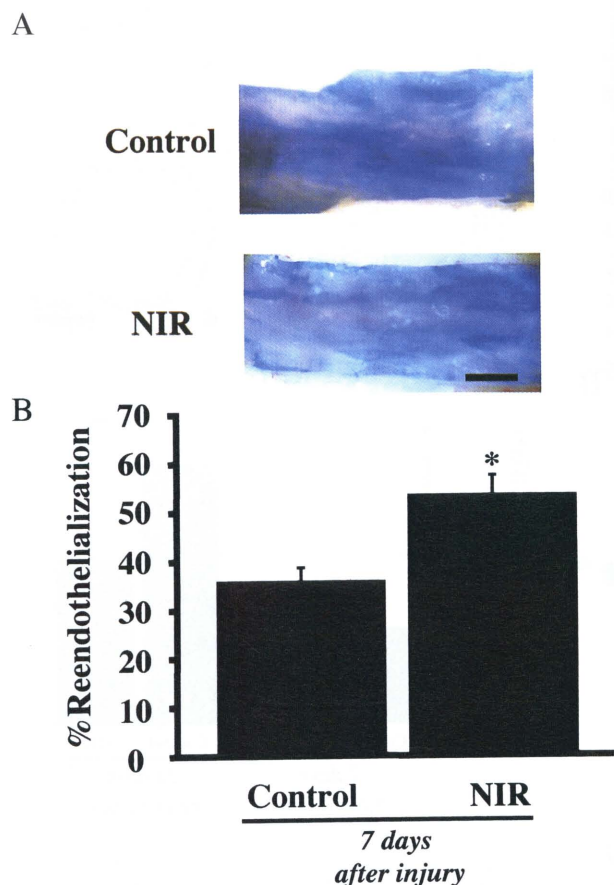


Fig. 7. Effects of NIR irradiation on reendothelialization after balloon-injury artery. (A) Representative macrophotographs of injured artery at 7 days after balloon injury. Reendothelialized area appears white. Bar indicates 1 cm. (B) Effects of NIR irradiation on reendothelialization in control and NIR groups ($n=5$ in each group). Reendothelialized area in NIR group is superior to that in control group. Results are expressed as $\bar{X} \pm \text{SEM}$. NIR, near-infrared ray. Statistical difference between control and NIR groups. * $P<0.05$.

内皮細胞 (Clonetics, San Diego, USA) を用いた。平滑筋細胞は 10% 仔牛胎児血清 (Gibco, Carlsbad, USA) を含んだダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) (Gibco) を、内皮細胞は血管内皮細胞増殖培地 EGM-2MV (三光純薬, 東京) を用いて 37℃, 5% CO₂, 水蒸気飽和の条件下で単層培養を行った。

2. 細胞増殖効果の検討

細胞増殖 ELISA キット (アマシヤム, 東京) を用い, NIR の培養細胞におよぼす影響をプロモキシデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) 取り込みを測定し, 検討した。内皮細胞, 平滑筋細胞とも 96 穴プレートに各穴 5000 個ずつ撒き, 内皮細胞は 2% 仔牛胎児血清を含んだ血管内皮細胞基礎培地 EBM-2 (三光純薬, 東京) で 24 時間, また平滑筋細胞は無血清の DMEM を用い 48 時間, 37℃, 5% CO₂, 水蒸気飽和の条件下で培養した。その後 NIR を 1, 5, 10 および 20 J/cm² 照射し, BrdU を加え 6 時間 37℃ にて培養した。固定および内因性ペルオキシダーゼの阻害を行った後, 発光基質を加えプレートリーダー MTP-120 (Corona, ひたちなか) にて測定した。結果は非照射群を 100% とし, その相対的な評価で比較検討した。

Ⅲ. 統計学的検討

結果は平均値±標準偏差 ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) で示した。I/M, PI,

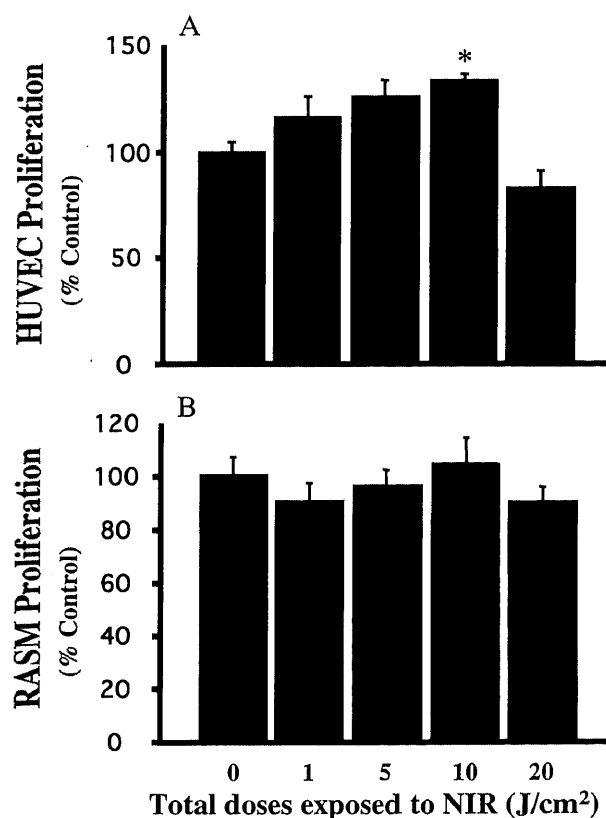


Fig. 8. Effect of NIR irradiation on BrdU uptake in cultured HUVEC (A) and RASM (B). HUVEC were significantly increased by NIR irradiation at 10 J/cm², but NIR didn't affect the proliferation of RASM. Results are expressed as $\bar{X} \pm \text{SEM}$. NIR, near-infrared ray; BrdU, bromodeoxyuridine; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; RASM, rat aortic smooth muscle cell. Statistical difference between control and NIR. * P<0.05.

TUNEL 指数, 再内皮化率の 2 群間比較は Mann-Whitney の U 検定を用いた。BrdU 取り込み率の比較は, Wilcoxon の符号付順位検定を用いて行った。なお, 危険率が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

成 績

I. ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおける新生内膜増殖におよぼす NIR 照射の影響

1. NIR 照射の温度効果

皮膚表面からの NIR 照射の血管表面温度の変化をウイスターラット 5 匹で検討した。血管表面温度は, 照射直前で 34.5 ± 0.3℃ であった。照射 10 分後は 34.5 ± 0.2℃, 照射終了 5 分後は 34.3 ± 0.1℃ であり, NIR 照射による有意な変化はなかった (図 3)。

2. バルーン傷害後の新生内膜増殖におよぼす影響

図 4A にバルーン傷害後の新生内膜増殖におよぼす NIR 照射の影響をみた実例を示す。未処置血管 (Aa) と NIR 照射のみの血管 (Ad) では内膜増殖はみられないが, バルーン傷害 2 週間後には Ab に示すように著明な内膜増殖が出現する。一方, バルーン傷害後 3 日間 NIR 照射を行った血管 (Ac) では, バルーン傷害による内膜増殖の著明な抑制がみられる。これらの内膜, 中膜面積を計測し I/M を比較した結果, 傷害後 7 日目ではコントロール群 0.45 ± 0.21 に対して NIR 群で 0.34 ± 0.11 と 25% の有意な抑制を認めた (P<0.05, 図 4B)。また傷害後 14 日目においてもコントロール群 1.34 ± 0.49 に対して NIR 群で 0.84 ± 0.39 と 49% の有意な抑制を示した (p<0.001, 図 4B)。

3. 平滑筋増殖およびアポトーシスにおよぼす NIR 照射の影響

傷害後 7 日目に PCNA および α -SMA にて免疫組織学的に検討を行った。 α -SMA 染色ではコントロール群及び NIR 群で新生内膜, 中膜共に均一に染色され, 新生内膜増殖が平滑筋細胞優位に構成されていることが示された (図 5Ac, d)。PCNA 染色により求めた PI は, コントロール群で 43.2 ± 9.1% であったのに対して NIR 群では 22.0 ± 16.3% と有意な抑制を認めた (P<0.01, 図 5B)。また, TUNEL 法でのアポトーシスの検討では, TUNEL 指数はコントロール群で 22.7 ± 4.3% に対して NIR 群では 23.8 ± 5.1% と両群間で差はなかった (図 6B)。

4. 傷害血管の再内皮化におよぼす NIR 照射の影響

エバンスブルー染色を用い, NIR による再内皮化への影響を検討した。図 7A に示すように, NIR 照射により白い部分が増加しており内皮化の促進がみられる。再内皮化された割合を比較すると, バルーン傷害後 1 週間目で NIR 群では 53.2 ± 10.8% であるのに対してコントロール群では 35.8 ± 6.9% であり, NIR 照射により再内皮化が有意に増加していた (P<0.05, 図 7B)。

Ⅱ. 培養細胞におよぼす NIR の影響

血管内皮細胞に対しては図 8A に示すように, 照射量依存性に BrdU の取り込みは増加し, 10 J/cm² で 35% の有意な BrdU 取り込み率の増加を認めた (P<0.05, 図 8A)。しかし, 20 J/cm² の照射では非照射群と差はなかった。一方, 平滑筋細胞に対しては, いずれの照射量においても BrdU 取り込み率に有意な変化はなかった (図 8B)。

考 察

今回, 経皮的 NIR 照射が血管形成術の再狭窄予防の新しい非

観血的治療法になるか否かを明らかにするため、ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおける新生内膜増殖や、また培養細胞におよぼすNIR照射の影響を検討した。その結果、ラットバルーン傷害モデルの検討では、経皮的NIR照射により新生内膜増殖が有意に抑制されるとともに、免疫組織学的な検討では平滑筋細胞増殖に有意な抑制効果がみられた。またNIR照射により再内皮化の促進がみられたが、TUNEL法で評価したアポトーシスには変化はなかった。一方、培養細胞による検討ではNIR照射による平滑筋細胞増殖抑制効果はなかったが、血管内皮細胞増殖促進効果が示された。これらの成績は、経皮的NIR照射はバルーン傷害後の新生内膜増殖を抑制し、その機序として再内皮化促進による平滑筋細胞増殖の抑制が関与している可能性を示唆している。

内皮細胞は血管壁における血管トームス、血小板や単球の接着、平滑筋増殖や細胞外基質の産生などに関してホメオスタシスを保つのに重要な役割を果たしており、正常血管では抗血栓、抗炎症作用に重要な役割を果たしている。Ross¹³⁾は細胞傷害反応説を提唱し、内皮細胞の解剖学的傷害や機能的な傷害が粥腫形成の始まりとなることを示した。したがって、内皮機能の改善や傷害内皮細胞の修飾は動脈硬化性疾患の治療において極めて重要な役割を果たすと思われる。Asaharaら¹⁴⁾¹⁵⁾は血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) による血管内皮増殖促進が新生内膜増殖を抑制することをラットや家兎バルーン傷害モデルにおいて報告した。一方、近年Kipshidzeら⁷⁾により、低出力レーザーが傷害血管の内皮化を促進することが報告された。彼らは家兎にコレステロール負荷を行った後、大腿動脈にバルーン傷害を加え動脈硬化モデルを作成した。傷害部位に血管内腔から低出力レーザーを3分間照射し、28日後に観察したところ有意に新生内膜増殖が抑制された。その機序として、彼らは組織学的にレーザー照射部位で内皮細胞が均一に認められることから再内皮化の促進がその主なる機序であると結論している。彼らの成績は、体表面からNIRを照射した今回の成績と一致している。

これまでNIR照射の血管への影響に関して検討した報告はみられない。NIR照射は主としてペインクリニック関連領域において低出力レーザーから発展し、より高い生体深達性が得られる新しい光線療法として多くの施設で臨床使用され、その臨床効果および安全性が示されている。Aritaら¹⁶⁾は4施設、68名の慢性疼痛患者を対象とした二重盲検比較試験で、偽照射群と比較してNIR照射群で痛みの指標となる視覚評価スケールが低下したことを報告した。また佐伯¹⁷⁾はNIRの星状神経節照射による心電図の影響を検討し、その照射によって亢進した心臓交感神経機能が抑制されることを示した。また、皮膚科領域においても褥創、創傷治癒に有効であるとの報告がみられる。Dannoら¹⁸⁾はマウスの皮膚傷害モデルを作成し、NIRによる創傷治癒促進効果を示した。培養細胞を用い、NIR照射が血管内皮細胞、繊維芽細胞の増殖を促進し、この効果が温度に依存せずNIRによる生物学的活性化によるものであると報告した。

NIR照射の作用機序に関してはDannoら¹⁸⁾の報告以外に詳細な検討はみられないが、低出力レーザーにおいてはいくつかの報告がみられる。Deckelbaumら¹⁹⁾は、培養平滑筋細胞の遊走が抑制されることを示し、Kipshidzeら²⁰⁾は培養内皮細胞を用い、低出力レーザーによってVEGF産生が増加し、内皮細胞の増殖を促進したと報告している。また低出力レーザーにより細

胞接着²¹⁾やミトコンドリア呼吸鎖が促進される²²⁾ことも報告されている。これらの低出力レーザーの作用機序は、PTCA後やステント挿入後の再狭窄に予防的に作用する可能性がある。この点について、すでに動物実験において家兎コレステロール食負荷血管傷害モデルにおいて、カテーテルを用いた低出力レーザー照射により新生内膜増殖が抑制されることが明らかにされている⁹⁾。またヒトへの臨床応用も開始されており、PTCA後のカテーテルによる低出力レーザー照射が安全に施行できることが報告された²³⁾。しかし、低出力レーザーは低出力であり、また0.6 μm 前後の単波長を用いているため、生体深達度が極めて低い欠点がある。このため、ヒトの臨床応用においてもカテーテルを使用し、生体内から局所照射を行う必要がある。カテーテルの使用は、特殊な照射用カテーテルが必要であり、繰り返し照射は患者の負担が大きく、また経済面でも効率が悪く、その臨床応用においては解決すべき重要な問題が多くみられる。一方、今回使用したNIRは、水とヘモグロビンに吸収されにくい0.6から1.6 μm の波長と最大2000 mWの出力のため、生体深達度が約5 cmと深く、経皮的照射が可能な点に特徴がある。現在の装置を用いても、下肢閉塞性動脈硬化症や透析患者のシャント静脈の血管形成術後の再狭窄予防には使用可能であり、非侵襲的に簡便に用いることができる利点がある。NIR照射による再狭窄予防の作用機序については全く検討されておらず、今回の検討で初めて再内皮化の促進による平滑筋細胞増殖抑制を示した。この作用機序からは、NIR照射は低出力レーザーと同様の生物学的効果が期待されるが、今後更に詳細な検討が必要である。

再狭窄は主としてバルーンによって拡張された後の血管壁のリコイルによる内腔の狭小化、冠動脈介入療法により生じた冠動脈壁の傷害に対する治癒機転としての新生内膜の過剰増殖、慢性期に生じる冠動脈再構築の3つの内腔狭小化の要因により生じると考えられている。これらの問題に対して、ステントに代表される道具の改良、薬物投与による予防、あるいは遺伝子導入による予防など様々な取り組みが行われている。

薬物療法により効果が期待できるのは内膜増殖と血管再構築の2つの要因が考えられる。しかし慢性期再狭窄予防としては、従来抗血小板薬、抗凝固薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、カルシウム拮抗薬などが期待されたが、いまだ臨床的に有効性が確立されていない。近年、抗ケロイド作用を有するトラニラストと抗酸化作用を有するプロブコールが有効と報告されている²³⁾²⁴⁾。トラニラストは我が国で行われたTREAT試験で600 mg/日の高用量をインターベンション施行翌日より開始し、3ヶ月後の再狭窄率は14.7%とプラセボ群に比べて有意に低値を示した。一方プロブコールは脂質低下作用とは無関係に強力な抗酸化作用による再狭窄率を低下させることが報告されている。またスタチン系薬剤も脂質低下以外に多様な効果が報告され、再狭窄予防に有効であったとの報告がみられる²⁵⁾²⁶⁾。しかし、これらの薬物もいずれも単独で十分な再狭窄予防効果は得られていない。

ステントは当初、急性冠閉塞に対する有効な治療手段として登場したが、PTCAの最大の欠点である比較的高い再狭窄率を克服する方法としての有用性も示され、飛躍的に普及した。血管径3 mm以下の短い病変に対する従来のPTCAとの比較を行ったBENESTENT試験において再狭窄率22%とPTCA群32%に比べて有意に良好な成績が示された²⁷⁾。これ以後ステントは急

速に普及したが、細い血管の病変や多数のステントが必要なびまん性の病変ではステント留置の有効性は明らかではない。またステント内再狭窄は従来のPTCAよりも再々狭窄率も高く、ことにステント内にびまん性に生じる再狭窄は再冠動脈介入術に抵抗性である。一方、近年注目を集めているのが薬剤放出性ステントである。特にシロリムスを塗布したステントは30例の臨床例に使用し、再狭窄や合併症がなかったとの報告²⁹⁾もあり、その長期成績も良好と報告されている²⁹⁾。今後の検討が必要であるが、期待される治療法である。一方、ガンマ線やベータ線を照射することにより細胞増殖を抑制する放射線療法もステント内再狭窄に有効と報告されている。WRIST試験において¹⁹²イリジウムを用いたステント内再狭窄例に対するガンマ線治療は再狭窄率を著明に減少させている³⁰⁾。一方で放射線活性を持たせたステントはステント両端部の放射の弱い部分に強い再狭窄が起こる現象 (candy wrapper) や、増殖抑制によりステントの被覆が進まないために起こる晩期の閉塞などが大きな問題がある。

また遺伝子制御を用いた予防も検討されている。Morishitaら³¹⁾はE2Fデコイを用い、血管平滑筋細胞の増殖抑制を試みている。また、再狭窄の最初のイベントが、内皮細胞の変性および脱落による動脈硬化の進展であることを考え、内皮細胞のみを特異的に増殖する内皮特異的増殖因子の遺伝子導入による内皮再生療法が注目されている³²⁾。Egashiraら³³⁾はケモカイン (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) に注目し、N末端の一部のアミノ酸が欠損した変異型MCP-1 (7ND) が、MCP-1活性を強く阻害することを見出し、バルーン傷害後の新生内膜増殖を抑制することを報告している。またAokiら³⁴⁾も肝細胞増殖因子を用い、その有用性を報告している。

従来の治療は再狭窄予防効果が不十分であり、また現在検討されている遺伝子制御を含めた新しい治療法はその有効性が期待されるが設備や価格等の問題もあり、また臨床の現場で使うには時間がかかる。今回検討したNIR照射装置は、経皮的照射にて効果が期待されることから清潔操作が不要である点、また操作が簡便であり非侵襲的である点、廉価である点、また何よりも副作用が認められないことから、再狭窄予防に対して有用な選択肢になりうると考えられた。特に閉塞性動脈硬化症や透析患者における内シャント再狭窄に対して、皮膚表面からの距離が近いことから良い適応になると考えられ、今後の臨床検討が期待される。

しかし、今回の検討ではいくつかの限界がある。第一は今回の検討は14日目までと短期間の観察である点である。今後臨床応用にのぞむにあたり、慢性効果を明らかにする必要がある。また、今回TUNEL法を用いてアポトーシスの観察を行った。しかし、近年の報告ではTUNEL現象自体はネクローシスやオオンコーシスを含む様々なタイプの細胞死などを含み、真のアポトーシスを過大評価している可能性は否定できない³⁵⁾。

さらに冠動脈に対する応用も検討が必要である。NIRは生体内で5 cm程度の深達度が得られるが、冠動脈への応用に際してはさらに深達度が必要となる。しかし、Tirlapurら³⁶⁾はNIRを用い標的レベルでエネルギー密度を増加させることで細胞膜に一過性の穴をあけ、遺伝子導入効率が上がったと報告した。多点照射によって標的部位での出力をあげることで、その応用が可能になると考えられ、冠動脈への応用に当たってはさらに装置の改良が必要である。

結 論

血管形成術後再狭窄予防に対する経皮的NIR照射の臨床応用の可能性を考え、ラットバルーン傷害モデルおよび培養細胞に及ぼすNIR照射の効果を検討し、以下の結論を得た。

1. 経皮的NIR照射により、ラットバルーン傷害モデルにおける新生内膜増殖が有意に抑制された。

2. 免疫組織学的検討では、平滑筋増殖の抑制を認めたが、アポトーシスの促進の関与はなかった。

3. 経皮的NIR照射により、ラットバルーン傷害モデルにおける再内皮化が有意に促進された。

4. 培養細胞においては血管内皮細胞増殖がNIRによって有意に促進されたが、平滑筋細胞は影響を受けなかった。

5. 経皮的NIR照射では血管レベルでの温度変化はなく、今回の結果は温度効果ではなく、NIR自体の効果と考えられた。

6. 経皮的NIR照射では明らかな合併症はなかった。

以上より、経皮的NIR照射は非侵襲的に新生内膜増殖を抑制し、その機序として再内皮化の促進の関与が示唆された。今後、非侵襲的な新しい再狭窄予防法としての臨床応用が期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御検閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し終始、御指導、御助言をいただきました金沢大学医学部保健学科高田重男教授、ラット大動脈平滑筋細胞を提供していただきました金沢大学大学院医学系研究科血管分子生理学多久和陽教授、組織学的検査を御指導いただきました金沢大学大学院医学系研究科分子細胞病理学小田恵夫助教授および金沢大学大学院医学系研究科 (旧内科学第一) 循環器班の諸先生方に深謝いたします。

なお、本研究の一部は、第66回日本循環器学会総会・学術集会 (平成14年3月、札幌) および第50回日本心臓病学会学術集会 (平成14年9月、名古屋) において発表した。

文 献

- 1) Landau C, Lange RA, Hillis LD. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 330: 981-993, 1993.
- 2) Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka K, Yokoi H, Hamasaka N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol* 12: 616-623, 1998.
- 3) Schofield PM, Sharples LD, Caine N, Burns S, Tait S, Wistow T, Buxton M, Wallwork J. Transmyocardial laser revascularisation in patients with refractory angina: a randomised controlled trial. *Lancet* 353: 519-524, 1999.
- 4) Horvath KA, Aranki SF, Cohn LH, March RJ, Frazier OH, Kadipasaoglu KA, Boyce SW, Lytle BW, Landolfo KP, Lowe JE, Hattler B, Griffith BP, Lansing AM. Sustained angina relief 5 years after transmyocardial laser revascularization with a CO₂ laser. *Circulation* 104: I-81-I-84, 2001.
- 5) Rockson SG, Kramer P, Razavi M, Szuba A, Filardo S, Fitzgerald P, Cooke JP, Yousuf S, DeVault AR, Renschler MF, Adelman DC. Photoangioplasty for human peripheral atherosclerosis: results of a phase I trial of photodynamic therapy with motexafin lutetium (Antrin). *Circulation* 102: 2322-2324,

2000

- 6) Chen Z, Woodburn KW, Shi C, Adelman DC, Rogers C, Simon DI. Photodynamic therapy with motexafin lutetium induces redox-sensitive apoptosis of vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 759-764, 2001
- 7) Kipshidze N, Sahota H, Komorowski R, Nikolaychik V, Keelan MH Jr. Photoremodeling of arterial wall reduces restenosis after balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *J Am Coll Cardiol* 31: 1152-1157, 1998
- 8) De Scheerder I, Wang K, Nikolaychik V, Kaul U, Singh B, Sahota H, Keelan MH, Kipshidze N. Long-term follow-up after coronary stenting and intravascular red laser therapy. *Am J Cardiol* 86: 927-930, 2000
- 9) De Scheerder IK, Wang K, Kaul U, Singh B, Sahota H, Keelan MH, Kipshidze NN, Moses J. Intravascular low-power laser irradiation after coronary stenting: long-term follow-up. *Lasers Surg Med* 28: 212-215, 2001
- 10) 大塚浩司, 大久保和章, 今井 真, 野 繁雄, 鵜物 修. 星状神経節近傍への直線偏光近赤外線照射によるレイノー現象の軽減. *麻酔* 41: 1814-1817, 1992
- 11) 輪嶋善一郎, 設楽敏朗, 井上哲夫, 小川 龍. 直線偏光型近赤外線治療器 (スーパーライザー™) による星状神経節近傍照射の皮膚温, 皮膚血流量に及ぼす影響. *麻酔* 45: 433-438, 1996
- 12) Yoo C, Lee W-K, Kemmotsu O. Efficacy of polarized light therapy for musculoskeletal pain. *Laser Therapy* 5: 153-157, 1993
- 13) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993
- 14) Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, Kearney M, Rossow S, Passeri J, Symes JF, Isner JM. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation* 94: 3291-3302, 1996
- 15) Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 91: 2793-2801, 1995
- 16) Arita H, Hanaoka K. Multi-center double-blind comparison study on a linear polarized infra-red ray therapy equipment (Super Lizer™). The Current State and Future of Super Lizer™ International Symposium Satellite of 9th Congress of the Pain Clinic. Luncheon workshop (abstracts): 3-4, 2000
- 17) 佐伯隆広. 直線偏光近赤外線の星状神経節照射が心電図および心拍変動に及ぼす影響. *十全医誌* 110: 252-262, 2001
- 18) Danno K, Mori N, Toda K, Kobayashi T, Utani A. Near infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: laboratory experiments on possible mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17: 261-265, 2001
- 19) Decklbaum LI, Scott JJ, Stetz ML, O'Brien KM, Sumpio BE, Madri JA, Bell L. Photoinhibition of smooth muscle cell migration: potential theory for restenosis. *Lasers Surg Med* 13: 4-11, 1993
- 20) Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses JM. Low-power helium:

- neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med* 28: 355-364, 2001
- 21) Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS, Esenaliev RO. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells in vitro. *Lasers Surg Med* 18: 171-177, 1996
 - 22) Morimoto Y, Arai T, Kikuchi M, Nakajima S, Nakamura H. Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration. *Lasers Surg Med* 15: 191-199, 1994
 - 23) Tamai H, Katoh O, Suzuki S, Fujii K, Aizawa T, Takase S, Kurogane H, Nishikawa H, Sone T, Sakai K, Suzuki T. Impact of tranilast on restenosis after coronary angioplasty: tranilast restenosis following angioplasty trial (TREAT). *Am Heart J* 138: 968-75, 1999
 - 24) Tardif J-C, Cote G, Lesperance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S, Bilodeau L, Nattel S, De Guise P, for the Multivitamins and Probucol Study Group. Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 337: 365-372, 1997
 - 25) Mulder HJ, Bal ET, Jukema JW, Zwinderman AH, Schalij MJ, van Boven AJ, Bruschke AV. Pravastatin reduces restenosis two years after percutaneous transluminal coronary angioplasty (REGRESS trial). *Am J Cardiol* 86: 742-746, 2000
 - 26) Walter DH, Fichtlscherer S, Britten MB, Rosin P, Auch-Schwelk W, Schachinger V, Zeiher AM. Statin therapy, inflammation and recurrent coronary events in patients following coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 38: 2006-2012, 2001
 - 27) Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, Belardi J, Sigwart U, Colombo A, Goy JJ, van den Heuvel P, Delcan J, Morel MA, for the Benestent Study Group. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 331: 489-495, 1994.
 - 28) Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, Kozuma K, Van Langenhove G, Sousa AGMR, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation* 104: 2007-2011, 2001
 - 29) Serruys PW, Degertekin M, Tanabe K, Abizaid A, Sousa JE, Colombo A, Guagliumi G, Wijns W, Lindeboom WK, Ligthart J, de Feyter PJ, Morice M-C, for the RAVEL Study Group. Intravascular ultrasound findings in the multicenter, randomized, double-blind RAVEL (RANDOMIZED study with the sirolimus-eluting VELOCITY balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo native coronary artery Lesions) trial. *Circulation* 106: 798-803, 2002
 - 30) Waksman R, White RL, Chan RC, Bass BG, Geirlach L, Mintz GS, Satler LF, Mehran R, Serruys PW, Lansky AJ, Fitzgerald P, Bhargava B, Kent KM, Pichard AD, Leon MB. Intracoronary-radiation therapy after angioplasty inhibits

recurrence in patients with in-stent restenosis. *Circulation* 101: 2165-2171, 2000

31) Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5855-5859, 1995

32) Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, Eranen J, Kiviniemi M, Narvanen O, Makinen K, Manninen H, Syvanne M, Martin JF, Laakso M, Yla-Herttuala S. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum Gene Ther* 11: 263-270, 2000

33) Egashira K, Koyanagi M, Kitamoto S, Ni W, Kataoka C, Morishita R, Kaneda Y, Akiyama C, Nishida K, Sueishi K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits vascular remodeling in rats: blockade of MCP-1

activity after intramuscular transfer of a mutant gene inhibits vascular remodeling induced by chronic blockade of NO synthesis. *FASEB J* 14: 1974-1978, 2000

34) Aoki M, Morishita R, Hayashi S, Jo N, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Inhibition of neointimal formation after balloon injury by cilostazol, accompanied by improvement of endothelial dysfunction and induction of hepatocyte growth factor in rat diabetes model. *Diabetologia* 44: 1034-1042, 2001

35) Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21: 1465-1468, 1995

36) Tirlapur UK, Konig K. Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature* 418: 290-291, 2002

Transcutaneous near-infrared ray irradiation accelerated reendothelialization and attenuation of neointimal formation in balloon-injured rat carotid arteries Takeshige Kunieda, Department of Cancer Gene Regulation, Gastroenterology and Nephrology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **111**, 317 — 325 (2002)

Key words near-infrared ray, restenosis, reendothelialization

Abstract

A near-infrared ray (NIR) system has an output up to about 2000 mW which corresponds to that of median-output laser and emits wavelengths limited to a range of 0.6 to 1.6 μm . These wavelength are barely absorbed by water and blood, and therefore provide deeper penetration into the living body. NIR irradiation has been found to decrease the inflammatory response, accelerate reendothelialization, and inhibit migration of vascular smooth muscle cells. To evaluate the possibility that NIR might be a novel and effective noninvasive therapy for restenosis after percutaneous angioplasty, the effects of NIR irradiation on neointimal formation in balloon-injured rat carotid arteries ($n=55$) as well as on cultured endothelial cells and vascular smooth muscle cells were investigated. In the balloon-injured model, NIR irradiation was transcutaneously applied for 10 minutes each on 3 consecutive days after the injury. NIR was performed using 70% of maximal power output with cycles of 2 sec on and 4 sec off. In the cultured-cell experiment, NIR irradiation was applied to human umbilical vein endothelial cells and rat aortic smooth muscle cells at 0, 1, 5, 10 and 20 J/cm^2 . NIR irradiation significantly reduced the intima/media ratio by 25% ($P<0.05$) and 49% ($P<0.001$) at 1 and 2 weeks, respectively. The appearance of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) at 1 week after balloon injury was significantly inhibited by NIR ($22.0 \pm 16.3\%$) compared with nonirradiated arteries ($43.2 \pm 9.1\%$, $P<0.05$). The extent of reendothelialization measured by Evans blue dye staining was significantly superior for arteries treated with NIR ($53.2 \pm 10.8\%$) compared with nonirradiated arteries ($35.8 \pm 6.9\%$, $P<0.05$). In vitro, NIR significantly increased the cultured endothelial cells at 10 J/cm^2 , but did not affect the proliferation of cultured smooth muscle cells. These results suggest that transcutaneous NIR irradiation inhibits neointimal formation, possibly by accelerated reendothelialization, so it is possible as a new apparatus for noninvasive treatment of restenosis after angioplasty.